FACTORII NEUROTROFICI ÎN SCLEROZA LATERALĂ AMIOTROFICĂ: IMPLICAŢII ETIO-PATOGENICE ŞI TERAPEUTICE

Irene Damian[1], N. Cârciumaru[2]
[1]Clinica de Neurologie, Spitalul Universitar CFR, Constanţa
[2]Catedra de Neurologie, Facultatea de Medicină „Ovidius", Constanţa

REZUMAT

O serie de observaţii recente susţin ideea potrivit căreia un deficit de factori neurotrofici ar putea contribui la producerea bolii neuronului motor, dacă acţionează concomitent cu alte procese patogenice. Articolul prezintă de asemenea o sinteză a datelor experimentale care sugerează un posibil rol terapeutic al acestor substanţe.
Cuvinte cheie: factori neurotrofici; scleroza laterală amiotrofică

ABSTRACT

A series of recent observations support the concept that a lack of neurotrophic factors, even if it does not lead to motoneuron disease on its own, could be a component in its development if it coincides with other pathogenic processes. The article also summarizes the experimental evidence that suggests a potential therapeutic role for these substances.
Keywords: neurotrophic factors; amyotrophic lateral sclerosis

De la descoperirea factorului de creştere al nervului (NGF-nerve growth factor) ca prototip de moleculă neurotrofică care condiţionează supravieţuirea neuronilor simpatici paravertebrali, o multitudine de alţi factori neurotrofici (unii cu acţiune asupra neuronului motor) au fost identificaţi şi descifraţi ca structură moleculară (tabelul 1).

Acest fapt indică complexitatea procesului de reglare a viabilităţii neuronilor motori; mai mult, o mare parte dintre aceşti factori sunt exprimaţi doar postnatal, dovedind influenţarea viabilităţii neuronilor motori în perioada post-natală prin factori neurotrofici, prin reglarea proprietăţilor funcţionale ale acestora (sinteza neurotransmiţătorilor, menţinerea stabilităţii şi activităţii sinaptice, controlul fenomenului de „înmugurire", etc.).

Nu se cunosc încă factorii neurotrofici care controlează supravieţuirea neuronală selectivă din cadrul fenomenului de „moarte fiziologică" în cursul dezvoltării ontogenetice a sistemului nervos motor. Acest rol a fost atribuit (în parte) muşchiului dar recent s-a observat că şoarecii deficitari în erb-B3, receptorul pentru factorul de creştere glial (GGF) prezentăm o reducere marcată a dezvoltării celulelor Schwann şi, în consecinţă, o scădere cu 75% a numărului neuronilor motori. Aceste date indică importanţa (cel puţin similară cu a muşchiului) a celulelor Schwann în dezvoltarea neuronului motor; dacă cele două influenţe

Tabelul 1
Factori neurotrofici pentru neuronii motori şi receptorii acestora (2)

Factor neutrofic	Receptor
Neurotrofine:	
BDNF (brain derived neurtofic factor)	p 75 NTR, t r k – B
NT – 3 (neurotrophin 3)	p 75 NTR, t r k – C
NT 4/5 (neurotrophin 4/5)	p 75 NTR, t r k – B
Familia CNTF – LIF:	
CNTF (ciliary neurotrofphic factor)	receptorul α al CNTF, receptorul β al LIF, gp 130
LIF (leukemia inhibitory factor)	receptorul α al CNTF, receptorul β al LIF, gp 130
CT – 1 (cardiotrofina 1)	receptorul β al LIF, g p 130 (şi posibil alt receptor)
HGF (hepotocyte growth factor)	c-met
Familia factorilor de creştere insulin –like:	
IGF I	receptorul 1 al IGF
IGF II	receptorul 1 al IGF, receptorul manoză-6-fosfat
Factori neutrofici de origine glială (GDNF) şi alţi factori înrudiţi	
GDNF	receptorul α al GDNF, c-ret
NTR (neurturina)	receptorul α-2 al GDNF, c – ret
Persephina	c – ret (şi posibil alt receptor)

se manifestă concomitent sau succesiv rămâne un subiect controversat.

Pe de altă parte, factorul de creştere neuregulin-glial, secretat de neuronul motor în dezvoltare, reglează expresia subunităţilor receptorului pentru acetilcolină de la nivelul muşchiului în dezvoltare (fiind denumit şi agentul inductor al receptorului pentru acetilcolină (ARIA). Receptorul erb-B3, care mediază efectele GGF-ARIA pe celulele Schwann, este exprimat şi la nivelul muşchiului şi ar putea fi responsabil de dezvoltarea adecvată a joncţiunilor neuromusculare, care condiţionează la rândul lor producerea de factori neurotrofici la nivelul muşchiului. Se pare că disfuncţia diferiţilor factori neurotrofici contribuie la propagarea procesului fiziopatologic şi distrugerea neuronală în boala neuronului motor la om (1).

Majoritatea formelor de scleroză laterală amiotrofică (SLA) sunt sporadice, spre deosebire de alte boli ale neuronilor motori (cum ar fi atrofia musculară spinală la copil şi adultul tânăr); aceasta nu înseamnă neapărat că ele nu sunt determinate genetic. Este posibil ca măcar o parte din aceste boli să aibă o origine multigenică, ele devenind aparente doar când survin concomitent mai mult defecte genetice. Aceste cazuri nu vor avea o transmitere mendeliană, putând astfel să apară drept cazuri sporadice; mai mult, la factorul genetic se adaugă, probabil şi factori exogeni. Alterări ale genelor factorilor neurotrofici ar putea contribui la această predispoziţie genetică, dat fiind că (3):

a. mulţi factori neurotrofici au receptori (sau subunităţi ale acestora) comuni cu alte molecule aparţinând aceleiaşi familii de gene. Astfel, în cazul unui defect genetic care produce scăderea sau lipsa expresiei unui factor, alţi membrii ai aceleiaşi familii de gene îi poate suplini lipsa, un deficit funcţional semnificativ survenind doar în lipsa mai multor asemenea factori neurotrofici (demonstrat experimental la şoarecii care nu exprimau CNTF şi LIF).
b. majoritatea neuronilor motori exprimă mai multe tipuri de receptori, specifici diferitelor specii de factori neurotrofici; căile prin care aceşti receptori îşi exercită acţiunea la nivel intracelular se întrepătrund parţial, fiind direct intercorelate. În consecinţă, neuronul motor ar putea primi influenţele unor factori neurotrofici aparţinând mai multor familii de gane, care s-ar suplini reciproc în cazul unor defecte genetice.
c. efectul antiapoptotic al factorilor neurotrofici interferă cu mecanismele patogenice (în special moartea neuronală indusă de glutamat şi radicalii liberi) care ar putea fi responsabile de producerea bolii neuronului motor.

Au fost descrise numeroase mutaţii ale genelor factorilor neurotrofici: în 1995 a fost identificată o mutaţie a genei cntf care produce o proteină CNTF biologic inactivă; această mutaţie s-a dovedit a fi foarte frecventă în Europa şi Asia (aproximativ 1/3 dintre locuitori fiind heterozigoţi pentru această mutaţie)

Procentul subiecţilor cu deficit de CNTF a fost raportat în diverse studii între 1-3%; numărul homozigoţilor pentru lipsa genei pare a fi similar în grupul subiecţilor sănătoşi şi al celor cu afecţiuni neurologice. S-a concluzionat astfel că deficitul de CNTF singular nu produce o afectare neurologică (4).

Mutaţii dirijate ale genei CNFT au fost induse la şoareci, în scopul elucidării efectului acestui factor neurotrofic asupra neuronului motor. Şoarecii mutanţi homozigoţi au prezentat pierderea a aproximativ 20% din neuronii motori, corespunzând unei reduceri a forţei musculare cu 10%, la 6 luni postnatal. La om se consideră că este necesară pierderea a peste 50% dintre neuronii motori pentru ca boala de neuron motor să apară (5).

A fost deasemenea semnalat un polimorfsim al genei LIF, care duce la pierderea funcţiei acestei proteine. Nu au fost raportate până în prezent mutaţii ale genelor cardiotrofinei–1, GDNF, neurturinei, sau persephinei la pacienţii cu SLA. Pentru mulţi dintre aceşti factori, transcripţia ARN-ului este reglată de diferiţi promotori sau produşii primari de transcripţie sunt ulterior procesaţi într-o manieră tisular-specifică, toate aceste mecanisme putând constitui sedii de acţiune a unor factori perturbatori.

NEUROTROFINELE (NT)

Neurotrofinele constituie o familie cu 5 proteine, înrudite cu NGF; BDNF (brain derived neurotrophic factor), NT 4/5, NT 3, NT 6 şi NGF.

Neurotrofinele se leagă de un receptor comun cu afinitate redusă (p 75^{NTR}) şi de un receptor specific cu afinitate mare: tr K-A (specific pentru NGF), tr K-B (specific pentru BDNF şi NT 4/5) şi tr K-C (specific pentru NT 3). Receptorii tr K sunt exprimaţi în mai multe variante de asamblare, efectul pozitiv asupra supravieţuirii neuronale al neurotrofinei fiind exercitat numai prin intermediul receptorilor cu structură moleculară completă (incluzând domeniile citoplasmatice tirozin-kinazice). Receptorul p 75 ^{NTR} este exprimat în concentraţii ridicate în timpul dezvoltării embrionare, care diminuă după naştere, dar cresc prompt după lezarea nervilor şi mai ales în SLA. Neuronii motori aflaţi în dezvoltare pot lega şi transporta retrograd NGF prin intermediul acestor receptori. Receptorul p 75^{NTR} este un membru al familiei receptorilor TNF/ Fas, care pot induce în mod activ moartea unor variate tipuri de celule, în prezenţa NGF (de exemplu: celulele ganglionare retiniene

aflate în dezvoltare, neuronii motori de la nivelul nervului sciatic şi facial după axonotomie la şobolani imediat după naştere, etc.).

În prezent, cercetările în domeniu încearcă să răspundă la întrebarea dacă receptorul p 75^{NTR}, exprimat la niveluri înalte în neuronii motori ai pacienţilor cu SLA, reprezintă un receptor „al morţii celulare", care mediază efectele proapoptotice ale NGF sau dacă prezenţa sa creşte sensibilitatea neuronului motor la efectul antiapoptotic al BDNF, NT 4/5 sau NT 3. Neuronul motor exprimă niveluri crescute de tr K-B cu structură moleculară completă şi, cel puţin o parte dintre neuronii motori exprimă şi tr K-C, care este un receptor celular specific pentru NT 3. Deşi virtual, toţi neuronii motori exprimă tr K-B, numai 50-60% dintre aceştia pot fi menţinuţi viabili prin intermediul BDNF in vivo sau in vitro; de aici rezultă intervenţia altor factori intra sau extracelulari care fac neuronii motori responsivi la BDNF sau NT 3; NT 3 este cea mai abundent exprimată neurotrofină în muşchiul scheletic (6).

Experimentele pe şoareci defectivi pentru NT 3 şi tr K–C au demonstrat că neuronii motori gama (care inervează fusurile neuromusculare) sunt dependenţi în dezvoltarea lor de NT 3, ca şi o parte din neuronii motori a (cum ar fi cei de la nivelul nucleului nervului facial). NT 3 este exprimată în cantităţi însemnate în neuronii motori aflaţi în dezvoltare, fiind posibil ca NT 3 să acţioneze într-o manieră autocrină la nivelul neuronului motor. Pe de altă parte NT 3 de la nivelul neuronului motor serveşte drept moleculă trofică pentru neuronii proprioceptivi care invadează măduva prin cornul dorsal pentru a stabili contacte cu neuronul motor din cornul medular ventral. NT 3 este şi un factor neurotrofic potent pentru neuronul motor central contribuind la ghidarea axonilor acestora în procesul de dezvoltare, cel puţin la nivelul neuronilor motori centrali care fac contact direct cu neuronii motori medulari (7). Expresia NT 4/5 în muşchiul scheletic este reglată de activitatea neuronală, aceasta fiind rapid scăzută după secţionarea nervului care inervează muşchiul respectiv şi crescută după stimularea electrică a nervului. Astfel, NT 4/5 pare implicată în reglarea activităţii plăcii neuromotorii (aşa cum au sugerat studiile efectuate pe animale de laborator).

FACTORUL NEUROTROFIC CILIAR (CNTF) ŞI MOLECULE ÎNRUDITE

După studiul prin clonare şi recombinare a CNTF la şobolan, a devenit evident că acesta este un factor neurotrofic potent pentru neuronul motor; această proteină nu este exprimată în cursul dezvoltării embrionare, într-o perioadă în care se produce moartea fiziologică, selectivă, a neuronilor motori. CNTF acţionează prin intermediul unui receptor alcătuit din trei subunităţi: o subunitate cu afinitate joasă de legare (receptorul a al CNTF) şi două proteine transmembrane (gp 130 şi receptorul b al LIF). Receptorul a al CNTF există atât în formă legată de membrana celulară cât şi sub formă solubilă (probabil secretată de fibrele musculare scheletice). Cele două proteine transmembrane (gp 130 şi receptorul b al LIF) prezintă similarităţi structurale importante, mai ales ale domeniilor intra celulare; acestea sunt deasemenea implicate în structura receptorilor pentru oncostatina M şi cardiotrofina-1, ceea ce subliniază suprapunerea funcţională parţială şi intercorelarea căilor metabolice de acţiune ale acestor receptori şi ale liganzilor lor.

CNTF nu este exprimat în timpul dezvoltării embrionare, dar este produs în cantităţi însemnate în celulele Schwann diferenţiate, deşi este secretat în cantităţi foarte mici (deoarece nu conţine o secvenţă hidrofobă necesară secreţiei). În condiţiile lezării nervului sau a integrităţii membranei celulei Schwann, CNTF este eliberat în mediul extracelular, acţionând asupra neuronilor adiacenţi. Expresia LIF este, dimpotrivă, scăzută în condiţii fiziologice dar aceasta creşte rapid după lezarea nervilor periferici. Dacă şoarecii homozigoţi pentru distrugerea genei CNTF suferă o pierdere a 20% din neuroni motori, cei care nu exprimă LIF nu prezintă nici o afectare a neuronilor motori. Totuşi, şoarecii homozigoţi pentru lipsa ambelor gene, prezintă o pierdere de aproximativ 30% dintre neuronii motori, cu o reducere cu aproximativ 30% a forţei musculare comparativ cu lotul martor. După lezarea nervului periferic la animalul adult, lipsa CNTF are un efect redus asupra supravieţuirii neuronului motor, pe când lipsa CNTF şi a LIF produce o supravieţuire de numai 66% a neuronilor motori la două săptămâni post-axonotomie. Aceste date indică faptul că CNTF, LIF şi probabil şi alţi membri ai familiei liganzilor pentru gp 130 şi LIFR – b, acţionează conjugat şi se suplinesc reciproc în cazul unor deficienţe datorate mutaţiilor genetice (8).

Şoarecii la care a fost distrusă gena receptorului b sau gena receptorului a ai LIF, sau gena gp 130, prezintă afectări severe ale sistemului nervos, incompatibile cu viaţa după naştere; aceştia prezintă o accentuare a fenomenului de moarte fiziologică a neuronului motor în timpul dezvoltării embrionare, ceea ce sugerează că cel puţin un membru al familiei de gene CNTF – LIF este implicat în reglarea viabilităţii celulare în această perioadă (9).

CNTF a fost testat la şoareci cu diferite mutaţii în scopul tratamentului experimental al bolii neuronului motor. Administrarea sa sistemică a avut efecte

semnificative asupra evoluţiei bolii, deşi mecanismele care stau la baza acestora nu sunt cunoscute. Date obţinute prin linkaj cromozomial au arătat că şoarecii cu diferite forme de afectare a neuronului motor sunt diferiţi genetic între ei şi nu sunt similari celor defectivi pentru gena CNTF, considerându-se că expresia CNTF este normală la aceştia. În cazul şoarecilor purtători ai mutaţiei ce provoacă neuropatia motorie progresivă, nivelul de CNTF endogen în nervul periferic este superior celui determinat în sânge după administrarea de CNTF exogen. Această observaţie confirmă faptul că doar o mică parte din CNTF este disponibilizat, în condiţii fiziologice, pentru neuronii motori, de la nivelul celulei Schwann. După secţionarea unui nerv, periferic însă şoarecii cu neuropatie motorie progresivă prezintă o rată de supravieţuire a neuronilor lezaţi net superioară faţă de şoarecii cu neuropatie motorie progresivă defectivi pentru gena CNTF supuşi aceleiaşi intervenţii, ceea ce demonstrează rolul de factor lezional al CNTF, capabil de „salvarea“ neuronilor lezaţi (5).

FACTORUL DE CREŞTERE HEPATOCITAR (HGF)

HGF şi receptorul său specific (receptorul c-met-tirozin kinaza) reglează creşterea, motilitatea şi morfogeneza multor tipuri de celule şi organe. S-a dovedit că HGF are un rol chemotactic pentru dezvoltarea axonilor motori (cât şi pentru celulele precursoare ale miocitelor) la nivelul mugurilor membrelor, în viaţa embrionară.

În stadii mai tardive ale ontogenezei, după ce muşchii scheletici s-au format deja, expresia HGF poate fi direct identificată la nivelul acestora. HGF are un efect favorabil comparabil cu al altor factori neurotrofici (CNTF, BDNF, GDNF) asupra supravieţuirii neuronilor motori izolaţi de la embrionul de şobolan în vârstă de 15 zile. Aceşti embrioni exprimă HGF începând din ziua a 14-a de dezvoltare, când debutează şi fenomenul de „moarte fiziologică“ a neuronilor motori.

În culturile de neuroni motori acţiunea concomitentă a HGF şi CNTF protejează neuronii motori de o parte dintre efectele toxice ale vincristinei. Totuşi HGF acţionează numai asupra a circa 40% dintre neuronii motori izolaţi, mai ales a celor care inervează membrele, ceea ce corespunde unei expresii diferite a HGF în diversele subpopulaţii neuronale.

În aproprierea naşterii, expresia c-met scade dramatic la nivelul neuronului motor, ceea ce indică faptul că neuronii motori răspund la HGF numai în perioada de dezvoltare. În prezent se încearcă reinducerea expresiei c-met şi a responsabilităţii la HGF a neuronului motor în SLA (10).

FACTORI DE CREŞTERE INSULIN-LIKE (IGF)

Această familie include: IGF I, IGF II, insulina şi relaxina; IGF există în cantităţi apreciabile în circulaţie şi acţionează ca şi hormoni (IGF I s-a dovedit a fi un efector al acţiunilor hormonului de creştere în diferite ţesuturi), majoritatea celulelor exprimând receptori pentru IGF.

Receptorul pentru IGF I, care mediază efectele celulare ale IGF I şi II este intens exprimat în creier în perioada de dezvoltare intrauterină, dar este supresat după naştere; totuşi, majoritatea neuronilor motori păstrează niveluri relativ înalte de expresie ale acestui receptor pe tot parcursul vieţii. Funcţiile specifice ale IGF I şi II pentru neuronii motori nu sunt pe deplin cunoscute. Acţiunea IGF este modulată de câteva proteine de legare (binding protein), şi cel puţin una dintre acestea (IGF – binding protein 5) este exprimată abundent la nivelul celulelor Schwann şi a muşchilor scheletici; este foarte probabil ca acţiunea IGF de origine glială şi musculară asupra neuronului motor să fie modulată de aceste proteine de legare, ele influenţând farmacocinetica şi biodisponibilitatea IGF injectate sistemic în scopuri terapeutice în SLA. Studiile efectuate pe şoareci care nu exprimau IGF I, II sau receptorii pentru IGF nu au fost concludente pentru rolul specific al IGF asupra neuronilor motori (aceştia prezentând deficite de dezvoltare a numeroase ţesuturi şi organe); în schimb în culturile de neuroni motori, IGF s-a dovedit un promotor potent al supravieţuirii acestora, iar injectarea sa în muşchii scheletici sau nervii lezaţi prin secţionare produce acelaşi efect, mai ales la nivelul înmuguririlor axonale şi al joncţiunilor neuro-musculare (2, 11).

FACTORUL NEUROTROFIC DE ORIGINE GLIALĂ (GDNF) ŞI MOLECULE ÎNRUDITE

GDNF s-a dovedit a fi un potent factor promotor al supravieţuirii neuronilor dopaminergici mezencefalici şi a neuronilor motori la şobolan; niveluri înalte de GDNF au fost evidenţiate la embrionul de şobolan de 15 zile la nivelul mugurilor membrelor posterioare, în culturile de celule Schwann precum şi în muşchii scheletici la animalul adult. Numeroase populaţii neuronale periferice, cum ar fi neuronii simpatici, sau cei ai rădăcinilor spinale posterioare nu răspund (sau răspund numai la concentraţii foarte înalte ale acestuia) la GDNF, ceea ce sugerează implicarea sa în atenuarea distrugerii neuronale selective în SLA; expresia GDNF creşte după lezarea nervului, GDNF acţionând astfel drept factor lezional pentru neuronii motori axonotomizaţi. GDNF acţionează prin

intermediul unui receptor format din două componente: unul cu afinitate scăzută (a receptorul GDNF) şi un al doilea constituit de c-ret-tirozin-kinaza transmembranară. şoarecii care nu exprimă GDNF sau subunitatea receptor c-ret-tirozin kinaza prezintă o reducere cu 20% a numărului neuronilor motori spinali lombari, în timp ce numărul neuronilor motori din nucleul neuronului facial nu este modificat (Abe şi colaboratorii, 2001).

Această observaţie este un argument împotriva rolului compensator al altor membrii ai aceleiaşi familii de gene: neurturina (NTR) şi persephina (P). Neurturina se leagă de a receptorul GDNF sau de receptori înrudiţi cu acesta (GFR-a-1, 2 şi 3), iar persephina doar de aceştia din urmă. Dintre cei 3 linganzi (GDNF, persephina şi neurturina) numai persephina este un factor neurotrofic specific pentru neuronii motori, neavând acelaşi efect asupra neuronilor senzitivi sau simpatici, chiar şi la concetraţii mari. Se pare aşadar că există o subunitate receptor specifică, exprimată numai la nivelul neuronului motor periferic, încă neidentificată.

Recent s-a raportat că expresia subunităţii c–ret a receptorului pentru GDNF este semnificativ scăzută în neuronii motori din măduva pacienţilor decedaţi cu SLA, deşi cvasitotalitatea neuronilor motori s-au dovedit imunoreactivi pentru c–ret. De aici rezultă potenţialul terapeutic al administrării de GDNF sau a altor molecule înrudite, în SLA (4, 12, 13).

POTENŢIALUL TERAPEUTIC AL FACTORILOR NEUROTROFICI ÎN SLA

Rezultatele studiilor clinice efectuate pentru a aprecia influenţa terapeutică a factorilor neurotrofici asupra SLA au fost descurajante; efectele acestora asupra progresiei bolii au fost slabe sau nesemnificative şi au fost semnalate efecte adverse notabile, mai ales în cazul CNTF.

Din păcate, nu se ştiu prea multe despre cum se modifică in vivo biodisponibilitatea şi farmacocinetica factorilor neurotrofici administraţi îni scopuri terapeutice.

În cazul IGF I şi II, există proteine de legare care modulează aceste proprietăţi, aceşti factori neurotrofici având şi capacitatea de a trece bariera hematoencefalică.

Deşi IGF I endogen se găseşte în cantităţi relativ crescute în sânge, acestea nu par accesibile neuronilor motori supuşi procesului de degenerare în SLA. Deasemenea, BDNF există în cantităţi crescute de trombocite dar nu e disponibil neuronilor motori afectaţi; funcţia fiziologică a BDNF trombocitar nu se cunoaşte; de aceea, administrarea sistematică a BDNF ar putea interfera aceste funcţii ducând la instalarea efectelor adverse. La aceasta ar putea contribui şi expresia receptorilor pentru factorii neurotrofici şi la nivelul altor ţesuturi decât neuronii motori (celulele hepatice exprimă receptori pentru HGF şi LIF, receptorii p 75^{NTR}, tr K-C şi tr K-B sunt bine reprezentaţi la nivelul sistemului nervos periferic, etc.). Date experimentale sugerează că factorii neurotrofici acţionează complementar şi aditiv în efectul lor asupra neuronilor motori (de exemplu: CNTF şi IGF–1), fapt care trebuie luat în considerare pentru ameliorarea rezultatelor terapeutice (13).

Hormonul de creştere (0,1 mg/Kg corp, administrat intramuscular de 3 ori pe săptămână) a fost comparat cu placebo la 75 pacienţi, pe o perioadă de 18 luni. Evaluarea s-a făcut la câte 2 luni, folosind MMT şi TQNE; rezultatele au fost statistic nesemnificative (14).

BDNF a fost testat în două trial-uri exploratorii, ale căror rezultate nu au fost publicate încă (15).

CNTF a fost utilizat în două trial-uri dublu orb, placebo controlate:

a. 15-30 mg/Kg corp/zi (subcutanat) timp de 9 luni la 730 de pacienţi, criterii de evaluare (forţa musculară izometrică, scala Schwab şi ALSFRS (Amyotrophic Lateral Sclerois Functional Rating Scale) determinate lunar, rezultate statistic nesemnificative;
b. 0,5-5 mg/Kg corp/zi (subcutanat) timp de 6 luni la 570 de pacienţi, criterii de evaluare: MVIC, capacitatea vitală şi SIP (Sickeness Impact Profile) determinate lunar; nu s-au observat efecte pozitive semnificative, dar rata de deces a fost dublă la cei trataţi cu 5 mg/Kg corp/zi (16).

IGF 1 în doze de 0,05 mg/Kg corp/zi – 0,1 mg/Kg corp/zi, administrate subcutanat a fost testat la 266 de pacienţi, într-un studiu dublu orb, placebo controlat (17) timp de 1 an. Criteriile de evaluare determinate lunar, au inclus SIP şi scala Appel; rezultate statistic semnificative s-au obţinut la un subgrup de pacienţi (cei cu progresie rapidă a bolii) dintre cei trataţi cu 0,1 mg/Kg corp/zi.

IGF1 recombinat a mai fost testat în tratamentul SLA prin 3 trial-uri randomizate, controlate (18):

- unul realizat în Europa pe 124 de pacienţi trataţi cu IGF recombinat în doză de 0,1 mg/Kg corp/zi subcutanat şi 59 de pacienţi trataţi cu placebo, timp de 9 luni, obţinându-se o diferenţă medie ponderată între cele 2 grupuri de 3,3 (95% CI) în ceea ce priveşte rata de progresie a bolii (măsurată prin scala Appel) în favoarea grupului tratat cu IGF;
- un al doilea studiu realizat de America de Nord pe 89 de pacienţi cu SLA trataţi cu 0,05 mg/Kg corp/zi subcutanat timp de 9 luni, şi 90 de pa-

cienţi trataţi cu placebo, a obţinut o diferenţă medie ponderată a ratei de progresie a bolii de 4,75 (95% CI) în favoarea grupului tratat cu IGF.

Substanţa a fost bine tolerată în ambele studii, cu excepţia apariţiei destul de frecvente a reacţiilor inflamatorii la locul injectării (risc relativ 2,53). Analizând rezultatele acestor două studii Mitchell şi colaboratorii (11), concluzionează că, deşi statistic semnificative acestea sunt insuficiente pentru a proba cu certitudine eficienţa IGF1 în tratamentul SLA.

Un adenovirus în alcărui genom fusese introdusă o secvenţă care să asigure expresia GDNF, a fost injectat în muşchiul gastrocnemian la şoarece (19). Aceasta a dus la niveluri crescute de expresie a GDNF transgenic, care au persistat peste 10 luni de la injectare; GDNF transgenic era distribuit la nivelul majorităţii neurofibrilelor, în vecinătatea sarcolemei dar mai ales la nivelul joncţiunilor neuro-musculare. În plus, GDNF transgenic a fost detectat în axonii neuronilor motori care asigurau inervaţia muşchiului respectiv, dovadă a transportului axonal retrograd al acestui factor neurotrofic.

Abe şi colaboratorii (20) folosind aceeaşi metodă la şoarecii mutanţi SOD_1 – G93A, au remarcat supravieţuirea unui număr statistic semnificativ mai mare de neuroni motori comparativ cu lotul martor, ca şi faţă de partea contralaterală injectării. Aceasta confirmă rolul GDNF de promotor al supravieţuirii neuronilor motori în SLA. Mai mult Wang şi colaboratorii (21), injenctând GDNF prin vectori virali în musculatura tuturor celor 4 membre la şoarecii transgenici SOD_1-G93A obţin o întârziere a debutului clinic şi a ratei de progresie a bolii, precum şi o creştere a duratei de supravieţuire a animalelor tratate.

Rezultate similare au fost obţinute de Acsadi şi colaboratorii (22): GDNF administrat la şoarecii cu diferite mutaţii ale SOD_1 a întârziat debutul bolii cu 7+/- 8 zile (valoare medie +/- SD) şi declinul funcţiilor motorii cu 7+/-4 zile, şi a prelungit supravieţuirea cu 17+/-10 zile.

În plus, Manabe şi colaboratorii (12) au observat că injectarea vectorilor adenovirali GDNF produce conservarea semnalului p-Akt promotor al supravieţuirii neuronale într-un număr semnificativ mai mare de neuroni motori comparativ cu lotul martor ($p < 0,05$), fără a influenţa însă activarea caspazelor sau evoluţia clinică a bolii la şoarecii cu mutaţii ale SOD_1.

Aceiaşi autori (13), au injectat GDNF în muşchiul gastrocnemian drept la şoarecii cu mutaţii ale SOD_1, de 3 ori/săptămână începând de la vârsta de 35 de săptămâni. După 11 săptămâni de tratament, nu s-a observat vreo deosebire privind manifestările clinice (comparativ cu locul martor) dar s-a înregistrat creşterea numărului de neuroni motori supravieţuitori şi a celor p-Akt pozitivi la animalele tratate cu GDNF, de partea injectării, fără modificări ale imunoreactivităţii pentru fosfo-ERK şi caspazele 3 şi 9. Aceste rezultate indică drept mod de acţiune al GDNF prezervarea semnalului promotor al viabilităţii p-Akt, fără influenţarea activării caspazelor.

Yamamoto şi colaboratorii (23) au folosit o altă metodă de transfer al genei GDNF: electroporaţia in vivo la nivelul musculaturii membrelor la şoareci cu mutaţii ale SOD_1, care a fost deasemenea urmată de expresia musculară a acestei gene şi transportul său retrograd la nivelul axonilor neuronilor motori. Deşi s-a constatat întârzierea deteriorării performanţelor motorii, manevra nu a produs creşterea numărului de neuroni motori viabili, nici supravieţuirea animalelor.

Sun şi colaboratorii (10) au demonstrat că supraexpresia HGF în sistemul nervos atenuează distrugerea de neuroni motori şi degenerarea axonală şi prelungesc durata de supravieţuire la şoarecii cu diferite mutaţii ale SOD_1. HGF a prevenit activarea caspazei-1 şi a i-NOS la nivelul neuronilor motori şi a menţinut nivelul de EAAT2 la nivelul astrocitelor activate.

Azari şi colaboratorii (8) au tratat şoarecii transgenici SOD_1-G93A cu 25 µg/Kg LIF administrat intraperitoneal, pe o perioadă de 6 săptămâni (începând de la vârsta de 70 de zile); examenul neuropatologic a relevat un număr statistic semnificativ mai mare de neuroni motori lombari supravieţuitori la animalele tratate comparativ cu lotul martor.

A fost semnalată deasemenea capacitatea TGF beta-1 (transforming growth factor) de a proteja neuronii împotriva agresiunilor excitotoxice şi oxidative, şi de a inhiba apoptoza în culturi celulare (24).

Factorii neurotrofici sunt în mod fiziologic produşi de celule care sunt în contact direct cu neuronii motori şi ajung la nivelul acestora prin intermediul unui circuit care implică situsuri de contact şi transfer specializate, situaţie care deocamdată nu poate fi reprodusă în cazul administrării terapeutice. Totuşi, efectele pozitive ale factorilor neurotrofici pe modelele animale de SLA, impulsionează ameliorarea tehnicilor de administrare, astfel încât aceste substanţe să fie captate şi transportate retrograd la nivelul neuronului motor. Promiţătoare în acest sens par a fi:

a. tehnica transferului genetic folosind vectori virali, în celulele Schwann sau miocite (realizată cu succes pentru BDNF);
b. administrarea intratecală;
c. implantarea intratecală a unor celule xenogenice modificate genetic şi încapsulate, care produc şi eliberează continuu, în concentraţii mici, asemenea factori neurotrofici.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. **Giess R, Holtmann B et al** – Early onset of severe familial amyotrophic lateral sclerosis with a SoD-1 mutation: potential impact of CNTF as a candidate modifier gene. *Am J Hum Genet*, 2002, 70(5), 1277-1286.
2. **Ranganathan S, Bowser R** – The 12th International Symposium on ALS/MND: scientific advancements in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathol*, 2002,12(4), 511-514.
3. **Kust BM, Copray JC et al** – Elevated levels of neurotrophins in human biceps brachii tissue of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol*, 2002, 177(2), 149-124.
4. **Silani V, Braga M et al** – The pathogenesis of ALS: implications for treatment strategies. *Neurol Neurochir Pol*, 2001, 35(1 Suppl), 25-39.
5. **Martin-Rendon E, Azzouz M et al** – Lentiviral vectors for the treatment of neurodegenerative diseases. Curr Opin Mol Ther, 2001, 3(5), 476-481.
6. **Eva Ekestern** – Neurotrophic factors and ALS. *Neurodegenerative diseases*, 2004, 1, 88-95.
7. **Guegan C, Vila M et al** – Instrumental activation of by caspase-1 in a transgenic moue model of ALS. *Mol Cell Neurosci*, 2002, 20(4), 553-562.
8. **Azari MF, Galle A et al** – Leukemia inhibitory factor by systemic administration rescues spinal motor neurons in the SOD1 G93A murine model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res*, 2001, 922(1), 144-147.
9. **Leigh PN, Garofalo O** – The molecular pathology of MND. London: Springer-Verlag, 1995, 139-161.
10. **Sun W, Funakoshi H et al** – Overexpression of HGF retards disease progression and prolongs life span in a transgenic mouse model of ALS. *J Neurosci,* 2002, 22, 6537-6548.
11. **Mitchell JD, Wokke JH et al** – Recombinant human insulin-like growth factor I (rhIGF-1) for amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. *Cochrane Database Syst Rev*, 2002, (3).
12. **Manabe Y, Nagano I et al** – Adenovirus-mediated gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor prevents motor neuron loss of transgenic model for amyotrophic lateral sclerosis. *Apoptosis*, 2002, 7(4), 329-334.
13. **Manabe Y, Nagano L Gazi MS et al** – Glial cell line-derived neurotrophic factor protein motor neuron loss of transgenic model mice for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res*, 2003, 25(2), 195-200.
14. **Smith RA, Melmed S et al** – Recombinant growth hormone treatment of ALS. *Muscle Nerve*, 1998, 16, 624-633.
15. **Przedborski S, Mitsumoto H et al** – Recent advances in amyotrophic lateral sclerosis research. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2003, 3(1), 70-77.
16. **Murray B, Mitsumoto H** – Therapy in amyotrophic lateral sclerosis. *Adv Neurol*, 2002, 88, 63-82.
17. **Krivickas LS, Yang JI et al** – Skeletal muscle fiber function and rate of disease progression in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle nerve*, 2002, 26(5), 636-643.
18. **Jackson M, Llado J et al** – Therapeutic developments in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin Investig Drugs*, 2002, 11(10), 1343-1364.
19. **Lu YY, Wang LJ et al** – Intramuscular injection of AAV-GDNF results in sustained expression of transgenic GDNF, and its delivery to spinal motoneurons by retrograde transport. *Neurosci Res*, 2003, 45(1), 33-40.
20. **Abe K, Manabe Y et al** – Gene therapy and neurotrophic factor treatment for amyotrophic lateral sclerosis. *Rinsho Shinkeigaku,* 2001, 41(12), 1160.
21. **Wang LJ, Lu YY et al** – Neuroprotective effects of glial cell line/derived neurotrophic factor mediated by an adeno-associated virus vector in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci*, 2002, 22(16), 6920-6928.
22. **Acsadi G, Anguelov RA et al** – Increased survival and function of SOD1 mice after glial cell-derived neurotrophic factor gene therapy. *Hum gene Ther*, 2002, 13(9), 1047-1059.
23. **Yamamoto M, Kobayashi Y et al** – In vivo gene electroporation of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) into skeletal muscle of SOD1 mutant mice. *Neurochem Res*, 2001, 26(11), 1201-1207.
24. **Ilzecha J, Stelmasiak Z et al** – Transforming growth factor-Beta 1 (tgf Beta 1) in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Cytokine*, 2002, 2095), 239-243.